

細胞培養によるトキソプラズマ原虫の 大量採取法の開発

I. HeLa 細胞とトキソプラズマ虫体増殖の関係

高木俊雄・手越達也・桜井治久・斎藤篤志・鈴木直義

(受理: 1984年5月28日)

An Improved Method of Mass Cultivation of *Toxoplasma gondii* in Cell Culture

I. Relationship between HeLa cells and multiplication of *Toxoplasma gondii*

Takao TAKAGI, Tatsuya TEGOSHI, Haruhisa SAKURAI,
Atsushi SAITO, Naoyoshi SUZUKI

摘 要

HeLa 細胞の長期間大量培養法の確立と、その細胞を宿主として用いたトキソプラズマ (Tp) 虫体の大量連続採取法の開発を目的として、基礎的な検討を行なった。

1) $4.8 \sim 10.0 \times 10^4$ cells/ml の HeLa 細胞を8日間培養し、最高 3.75×10^5 cells/ml まで細胞を増殖させた。

2) プラスチック培養フラスコの 5cm×5cm の面を底面として、 1×10^7 個の HeLa 細胞と 1×10^8 個の Tp 虫体を同時に6時間培養すると、高い虫体感染率が得られた。

3) Tp 虫体数を 0.5×10^8 個に変えて、2) の条件で培養した細胞と虫体を浮遊培養すると、84時間で、感染時と比較し 17.3~18.6 倍の虫体の増数がみられた。

緒 言

近年、トキソプラズマ抗原の特異的および非特異的免疫原性が生体の諸種感染に対して防御能を増強することが明らかにされつつある^{1, 8, 9, 10)}。トキソプラズマ抗原の諸種感染に対する防御効果とその機構をより明らかにするためには、大量のトキソプラズマ虫体が必要である。現在、トキソプラズマ虫体の大量採取は、

主としてマウス腹腔内接種法、あるいは、発育鶏卵接種法に依存している。しかし、これらの方法によるトキソプラズマ虫体の採取では、異種抗原となり得る夾雑物の混入が避けられない。これに対して、in vitro の系において培養細胞を宿主として使用した場合は、純度の高いトキソプラズマ虫体の採取ができると報告されている^{2, 11)}。しかし、比較的大量のトキソプラズマ虫体の採取に成功した報告は、著者らの知る範囲で

帯広畜産大学獣医学科家畜生理学教室

Department of Veterinary Physiology, School of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan 080

は、BRAVENY ら (1978)³¹ による human larynx carcinoma 細胞の単層培養法および VALKOUN と CINÁTL (1979)¹²⁾ による HeLa 細胞を用いた短時日の浮遊培養法だけである。従って、一週間以上の連続培養によるトキソプラズマの大量採取に成功した報告は、未だ世界において皆無である。

そこで、本研究の最終目的を、長期間細胞大量培養法の確立と、その細胞を宿主として用いたトキソプラズマ虫体の大量、かつ連続採取法の開発においた。この最終目的達成の第一段階として、in vitro の系における細胞およびトキソプラズマ虫体の増殖に関する基礎実験が行なわれた。

材料および方法

1. トキソプラズマ虫体の宿主となる培養細胞

限られたスペースで大量の細胞が培養でき、細胞数の算定や細胞の移し替えも簡単な浮遊細胞がトキソプラズマ虫体分裂増殖の宿主細胞として選択された。浮遊状態でも増殖可能な HeLa 細胞は、東京大学医学部細菌学教室の野本明男助教授の御厚意により供与された。この HeLa 細胞は、5% 熱非働化牛胎仔血清 (FCS) 加 MEM (1 l に浮遊培養用のイーグル MEM 培地「ニッスイ」④; 日水製薬 10.3 g とグルタミン「ニッスイ」; 日水製薬 0.292 g を含む、pH 7.2) にて 37°C、5% CO₂ 孵卵器内で、シャーレを用いた単層培養として継代された。実験に際しては、シャーレの培養液を除去し、EDTA 液 (EDTA 0.04 g/200 ml PBS (-)); 1 l 中に塩化ナトリウム 8 g、塩化カリウム 0.2 g、リン酸一水素ナトリウム (無水) 1.15 g、リン酸二水素カリウム (無水) 0.2 g を含む) で 2 回洗浄後、トリプシン液 (Trypsin 1:250; Difco 0.05 g/200 ml PBS (-)) を加え、孵卵器内で 5 分間静置後、5% FCS 加 MEM を加えて遠心 (200 g, 5 分, 室温)、その沈渣を再び 5% FCS 加 MEM に懸濁し、細胞浮遊液として使用した。

尚、本実験における培養液および細胞あるいはトキソプラズマ虫体調整液は、全て使用前に 37°C に加温して使用された。

2. トキソプラズマ虫体

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*; 以下 T_F と略す) 虫体は、当家畜生理学教室において ICR/JCL 系マウス腹腔内接種によって継代された T_F RH 株の栄養型虫体を使用した。実験に際しては、感染 2 日目

のマウス腹腔内を HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; 1 l に塩化ナトリウム 8,000 mg, 塩化カリウム 400 mg, リン酸一水素ナトリウム (無水) 47.9 mg, リン酸二水素カリウム (無水) 60 mg, 硫酸マグネシウム (無水) 48.8 mg, 塩化マグネシウム (無水) 46.8 mg, 塩化カルシウム (無水) 140 mg, ブドウ糖 1,000 mg, フェノールレッド 6 mg を含む。更に、ヘパリン 5 単位/ml, ペニシリン G カリウム 100 単位/ml, および硫酸ストレプトマイシン 100 μg/ml を含む、pH 7.3) にて洗浄し、腹腔内液中の付着性細胞をガラスフィルター (3 G 3; HARIO) で除去後、遠心 (800×g, 10 分, 室温) し、その沈渣を 5% FCS 加 MEM に懸濁して T_F 虫体懸濁液として使用した。

3. 攪拌培養装置

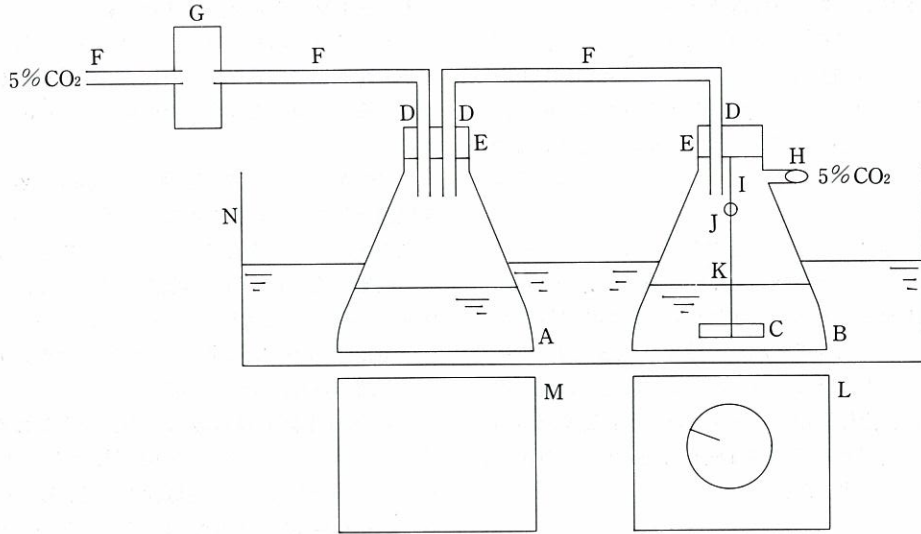
本研究では、攪拌培養法が細胞を浮遊状態で培養するために用いられた。浮遊培養を行なうために、Figure 1. および Plate のような装置を作製した。再蒸留水の入った 500 ml の三角フラスコと 5% FCS 加 MEM の入った吸引ビン (培養ビン) をシリコンチューブで継ぎ、恒温槽に入れ、培養温度を 37°C に保った。攪拌装置としては、培養ビンの底に触れないようにマグネットを「つり糸」で吊し、恒温槽の下に置いたマグネチック・スターラーで回転させた。培養液の蒸発を防ぐために 5% CO₂ を含んだ空気は、再蒸留水の入った三角フラスコ内を一度通過させてから培養液の入った培養ビンに導かれた。

4. HeLa 細胞の浮遊培養

細胞数 4.8~10⁴ cell/ml に調整された細胞浮遊液 250 ml を培養ビン (Figure 1. の B) 内に入れ、マグネットを回転させて培養した。細胞数の測定は、5 ml の細胞浮遊液を培養ビンから取り出して、ノイバウエル血球計算盤を用いて算出した。細胞が死期に移行するのを防ぐために、培養は必要な時期に培養ビンに 125 ml の細胞浮遊液を残し、新鮮な 5% FCS 加 MEM 125 ml を加えた。

5. トキソプラズマ虫体感染培養

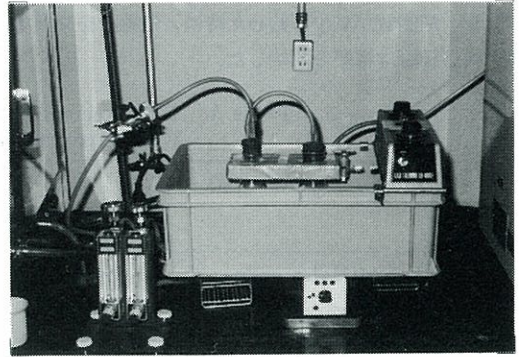
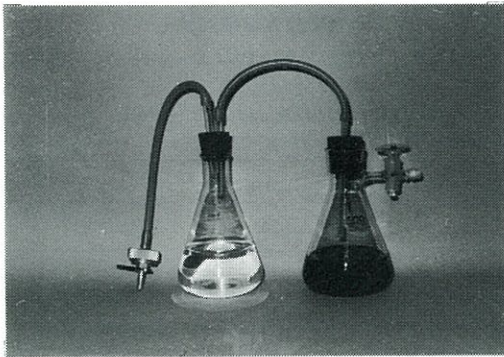
HeLa 細胞と T_F 虫体の接触の機会を多くすることにより虫体の細胞感染率が高くなるのではないかとこの仮定に基づき¹¹⁾、細胞と虫体が同時に培養面の面積の小さなプラスチック培養フラスコ (5 cm×5 cm×2 cm; CORNING) 内で培養された。培養 6 時間後に EDTA 液とトリプシン液を用いて全ての細胞と虫体を遠心管に回収し、遠心 (200×g, 5 分, 室温) し、



- | | |
|----------------------|----------------------|
| A : Erlenmeyer flask | H : cotton |
| B : filtrating flask | I : wire |
| C : magnet | J : snap |
| D : glass tube | K : line |
| E : rubber stopper | L : magnetic stirrer |
| F : silicon tube | M : stand |
| G : air filter | N : water bath |

Figure 1. The spinner culture apparatus

Plate: Photographs of spinner culture Apparatus



その沈渣を正常マウス血清に懸濁して塗抹標本を作成し虫体の細胞感染率を算出した。

プラスチック培養フラスコは、5cm×5cm の面を底面として感染培養に使用された。感染培養は、5% FCS 加 MEM 10ml に 1×10^7 個の細胞を懸濁した

細胞浮遊液に、5% FCS 加 MEM 1ml に 1×10^8 個の虫体懸濁液を加え、37°C、5% CO₂ 孵卵器内で行なわれた。5cm×5cm の面を底面として感染培養を行なった場合は、そのほかに 0.7×10^8 個および 0.3×10^8 個の虫体を懸濁した虫体懸濁液も使用した。

6. トキソプラズマ虫体増殖培養

プラスチック培養フラスコの $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面として 1×10^7 個の細胞を含む細胞浮遊液 10ml と 1×10^8 個および 0.5×10^8 個の虫体を含む虫体懸濁液 1ml を使用して感染培養を行なった細胞・虫体懸濁液を用いて、培養ビン (Figure 1 の B) で虫体の増殖を試みた。

虫体感染培養を行なった 2 本のプラスチック培養フラスコから回収した細胞・虫体懸濁液の 10 分の 1 量は、虫体の細胞感染率と穿入虫体数からみた感染細胞の割合の算出のために使用された。残りは、250ml の 5% FCS 加 MEM に懸濁され、培養ビンに入れられ、浮遊培養され、虫体増殖培養とされた。培養開始 24 時間後から、12 時間毎にその培養液を 5ml ずつ取り出し、遊出虫体数を算出した。

結 果

1. HeLa 細胞の浮遊培養

シャーレを用いて単層培養した HeLa 細胞を培養ビン内で浮遊培養した場合の細胞数の推移を Figure 2 に示した。

3 回の実験において、ともに細胞は浮遊培養開始 48 時間までに 2 倍以上に増殖した。また、培養液交換後最初の 24 時間では、細胞の増殖が低下し、時には細胞数が減少した例も認められた。24 時間目から 48 時間目にかけて細胞の増殖が最も高く、48 時間目から 72 時間目にかけて細胞の増殖が低下し、極端に細胞数が減少した。細胞数が減少し始めた時に、培養液を交換すると再び細胞は増殖を開始した。

2. トキソプラズマ虫体感染培養

プラスチック培養フラスコで T_p 虫体と HeLa 細胞とを 6 時間感染培養を行なった後、塗抹標本を作製し、虫体の細胞感染率を算出した結果を Table 1 に示した。

1×10^8 個の T_p 虫体を使用して、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ の面を底面として感染培養を行なった場合と $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面として感染培養を行なった場合を比較した。その結果、培養 6 時間での感染率は、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ の底面の場合で $40.6 \pm 8.2\%$ 、 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の底面の場合で $59.1 \pm 8.9\%$ となり、両者の間には推計学的に有意差が認められた ($P < 0.001$)。

一方、 T_p 虫体の投与数による感染率の影響を検討するために、 T_p 虫体、 1×10^8 個、 0.7×10^8 個をそれぞれ $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面として、細胞に接種した。培養 6 時間での感染率は、 T_p 虫体 1×10^8 個、 0.7×10^8 個、 0.3×10^8 個を使用した場合で、それぞれ $59.1 \pm 8.9\%$ 、 $43.6 \pm 1.3\%$ 、 $23.2 \pm 8.9\%$ であった。 1×10^8 個と 0.7×10^8 個、あるいは、 1×10^8 個と 0.3×10^8 個の虫体を使用した場合の感染率は、いずれも推計学的に有意差を示した ($P < 0.01$)。同様に、 0.7×10^8 個と 0.3×10^8 個の虫体を使用した場合の感染率にも、有意差が認められた ($P < 0.01$)。

上記のような実験条件では、 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面として 1×10^7 個の細胞と 1×10^8 個の虫体を使用して感染培養を行なった場合が、最も感染率が高くなることが明らかになった。

3. トキソプラズマ虫体増殖培養

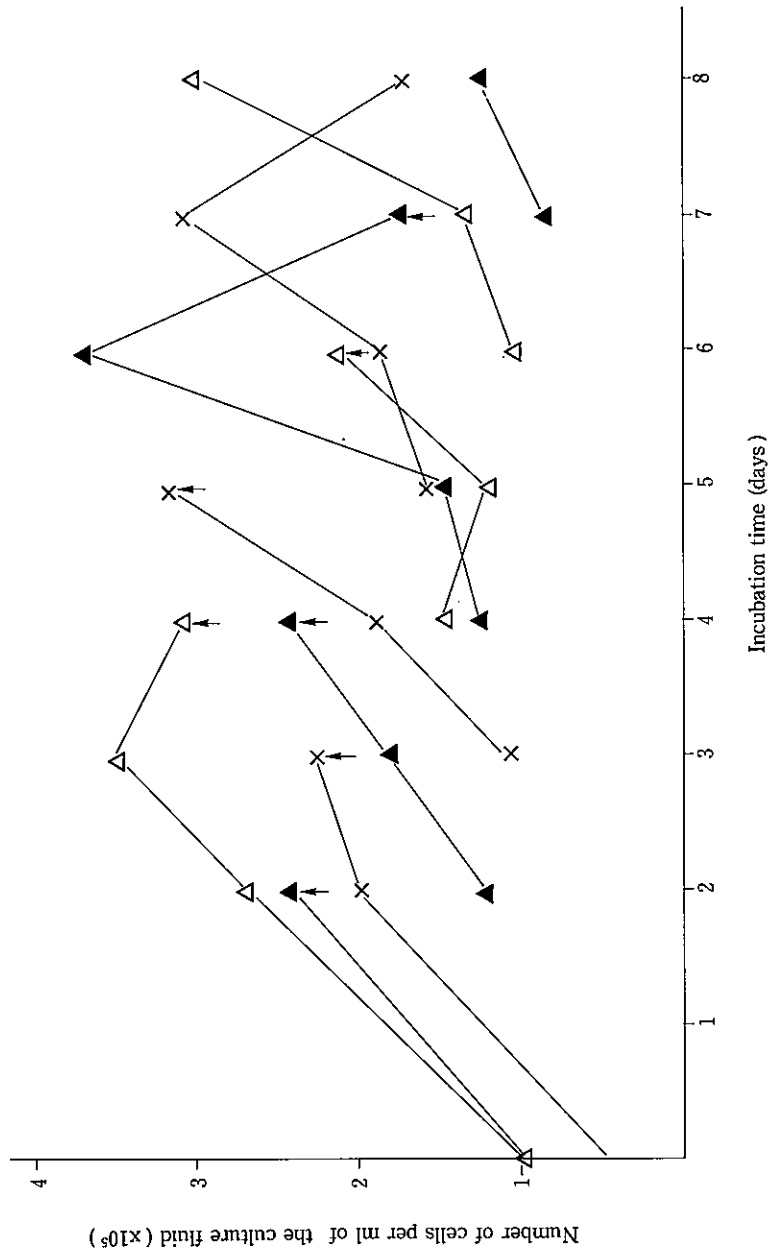
プラスチック培養フラスコの $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底

Table 1. Relationship between percentage of HeLa cells infected with *Toxoplasma* and size of culture area

	Size of culture area			
	$5\text{cm} \times 2\text{cm}$		$5\text{cm} \times 5\text{cm}$	
Number of HeLa cells	1.0×10^7		1.0×10^7	
Number of <i>Toxoplasma</i> inoculated	10.0×10^7	10.0×10^7	7.0×10^7	3.0×10^7
Mean percentage of infected HeLa cells 6 hours postinoculation	$40.6 \pm 8.2^*$	$59.1 \pm 8.9^{**}$	$43.6 \pm 1.3^{**}$	$23.3 \pm 8.9^{***}$

Remarks: Mean \pm SDM was calculated from the results of 1-3 independent experiments. In each experiment, 5 portions per smear were counted.

* ; n = 15, ** ; n = 10, *** ; n = 5



Remarks : ↑ ; medium change

Δ-Δ, ▲-▲ and X-X ; individual experiments

Figure 2. Growth of HeLa cells in suspension culture

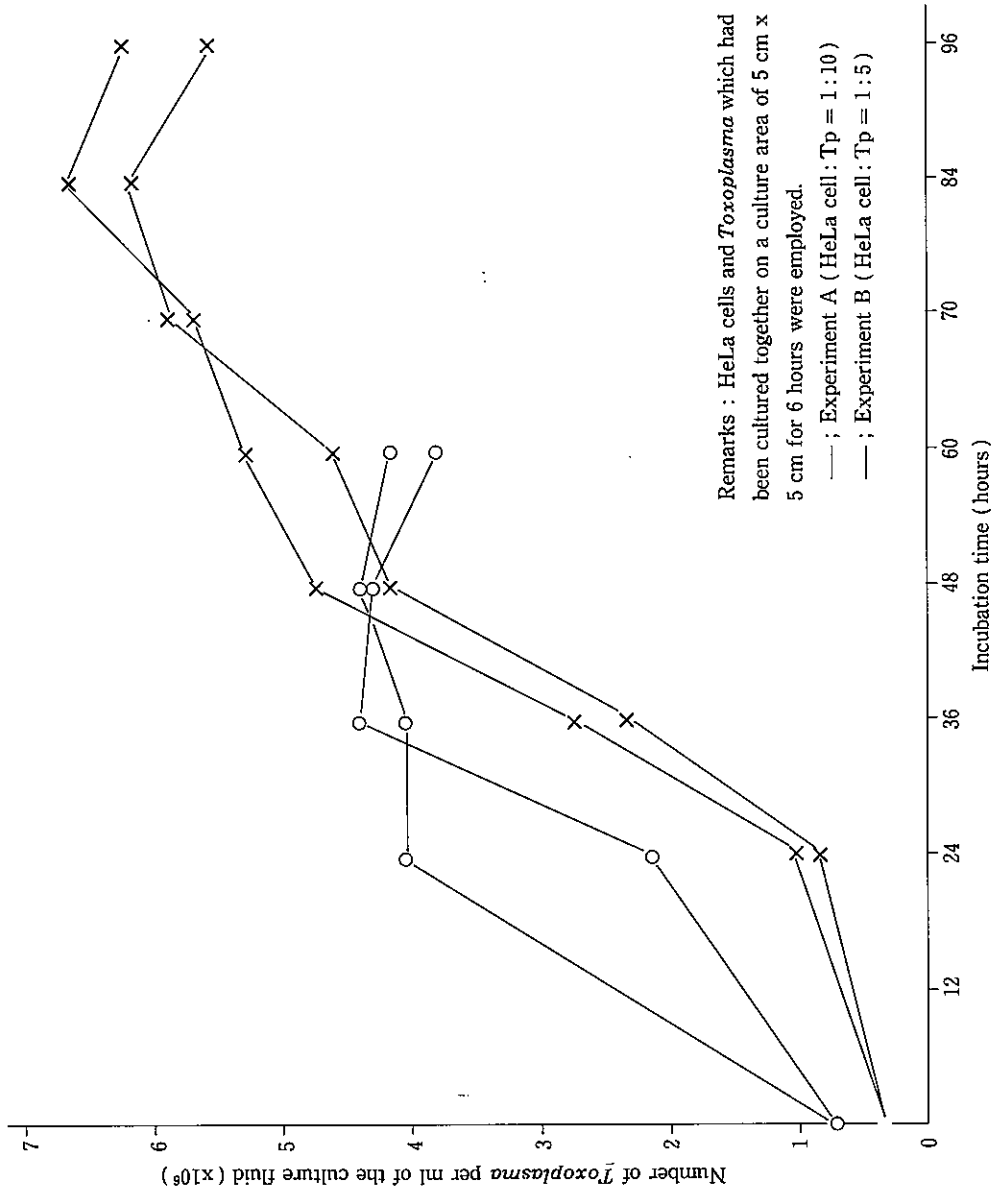


Figure 3. Multiplication of *Toxoplasma* in suspension culture

Table 2. Relationship between invasion of HeLa cells by *Toxoplasma* and size of inocula

Experiment	Ratio of inoculation (HeLa cell: <i>Toxoplasma</i>)	Mean percentage of infected HeLa cells 6 hours postinfection			
		Infected cells /total cells	Number of <i>Toxoplasma</i> per infected cell		
			1-3	4-7	8 \leq
A	1:10	62.3 \pm 6.3	26.5 \pm 4.1	51.8 \pm 5.6	21.7 \pm 5.2
B	1:5	43.3 \pm 8.8	78.8 \pm 3.9	20.9 \pm 4.2	0.3 \pm 0.5

Remarks: 1×10^7 HeLa cells were employed on a culture area of 5cm \times 5cm. Mean \pm SDM was calculated from the results of 2 independent experiments. In each experiment, 5 portions per smear were counted. (n=10)

面として虫体感染培養を行なった HeLa 細胞と T_P 虫体を浮遊培養した時の培養液中に遊出してきた虫体数を Figure 3. に示した。また, Table 2 には, 虫体の細胞感染率と穿入虫体数から見た感染細胞の割合を記載した。

1×10^7 個の細胞と 1×10^8 個の虫体を 1:10 の割合にて感染培養した場合, 虫体増殖培養開始 0 時間目の虫体数は, 計算上 7.2×10^5 T_P /ml となるが, 増殖培養 36 時間目, あるいは, 48 時間目の遊出虫体数は, $4.38 \sim 4.41 \times 10^6$ T_P /ml になり, 6.1 倍に達した。その後は遊出虫体数は, 徐々に減少した。

1×10^7 個の細胞と 0.5×10^8 個の虫体を 1:5 の割合にて感染培養した場合, 虫体増殖培養開始 0 時間目の虫体数は, 計算上 3.6×10^5 T_P /ml となるが, 増殖培養 36 時間目の遊出虫体数は, $2.33 \sim 2.76 \times 10^6$ T_P /ml になり, 6.5 \sim 7.7 倍に増加した。その後も遊出虫体数は増加し, 84 時間目で $6.21 \sim 6.70 \times 10^6$ T_P /ml となり, 17.3 \sim 18.6 倍にまで達した。しかし, 96 時間目では, 遊出虫体数は減少した。

この増殖培養の開始時における穿入虫体数から見た感染細胞の割合を, 穿入虫体数 1 個から 3 個, 4 個から 7 個, 8 個以上の順に記すと, 1:10 の場合は, $26.5 \pm 4.1\%$, $51.8 \pm 5.6\%$, $21.7 \pm 5.2\%$ であり, 1:5 の場合は, $78.8 \pm 3.9\%$, $20.9 \pm 4.2\%$, $0.3 \pm 0.5\%$ であった。それぞれの場合の 1 個から 3 個と 4 個から 7 個, および 8 個以上の穿入虫体数を持つ感染細胞の割合の間には, それぞれ推計学的に有意差が認められた ($P < 0.001$)。また, この時の虫体の細胞感染率は, 1:10 の場合で $62.3 \pm 6.3\%$, 1:5 の場合で $43.3 \pm 8.8\%$ であり, 両者の間には推計学的に有意差が認められた ($P < 0.001$)。

考 察

浮遊培養の細胞は, 培養開始後比較的長い遅滞期の後, 対数期に入り, もし培養液を交換しなければ, 比較的早く定常期に達し, 速やかに死期に移行すると言われている⁵⁾。梶原 (1976)⁶⁾ は, 独自に考察された Spinner 用培養ビンを用いた HeLa 細胞の Stock culture に利用して, 24 時間ごとに培養の半量を除き, 同量の新鮮な培養液を加えて, 細胞数が $2.0 \sim 2.5 \times 10^5$ cells/ml \sim $4.0 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/ml の間にあるようにしている。細胞の塊状化, あるいは, ビン壁への付着が激しくなる 3 週間目前後に細胞をトリプシン処理し, 新しい培養ビンに移して培養を継続している。このような条件では, HeLa 細胞の定常期に達する細胞数は, 5×10^5 cells/ml であるが, 頻繁に新鮮な培養液と交換すれば 1×10^6 cells/ml 程度まで維持でき, 37°C に加温された培養液を用いれば, 培養の 50% を新鮮な培養液と交換しても, 細胞の増殖速度に与える影響は比較的小さいとされている。しかし, 本研究における浮遊培養では, HeLa 細胞の数は最高で 3.75×10^5 cells/ml まで増殖した。また, 培養の約半量と 37°C に加温された新鮮な培養液を交換すると, 細胞の増殖速度が著しく低下し, 細胞の増殖に大きな影響を与えた。このため, 培養液の交換量を減らし, 培養ビン内に残される細胞を多くして培養を継続すれば, 細胞の増殖に与える影響も小さく, 本研究で得られた最高値を上まわる細胞数を得ることは可能であると考えられる。また, 8 日目までの培養で, 細胞塊の出現は少なく, 細胞のビン壁への付着も認められなかったので, 本培養法を用いれば, 8 日間以上の長期連続培養も技術的には不可能ではないと推察される。

予備実験で、浮遊培養中の HeLa 細胞に T_P 虫体を感染させた。しかし、感染後、培養液中に遊出した虫体の数は増加しなかった。そこで、浮遊培養中の HeLa 細胞に T_P 虫体は感染しにくいものと考え、虫体増殖培養の前に、細胞を虫体に感染させるために、虫体感染培養を行なった。感染培養において最も重要なことは、虫体と細胞の接触の機会が多くなることである。この事から、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ と $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の 2 種の培養面を選定した。即ち、 1×10^7 個の細胞を用いたこの実験では、 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面にする、細胞は単層に近い状態で沈み、わずかな細胞空間に虫体が沈むものと推察された。一方、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ の面を底面にする、細胞は重なり合って沈み、更に虫体と細胞の接触の機会が多くなるものと考えられた。いずれの場合も高い虫体の細胞感染率を示すと推測される。しかし、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ の面を底面とした場合の感染率は、 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の面を底面とした場合より明らかに低値を示した。この結果の要因は明らかではないが、 $5\text{cm} \times 2\text{cm}$ の面を底面とした場合、細胞と虫体の沈降速度の違いにより、細胞が虫体より先に沈んだ結果、虫体と細胞の接触の機会が少なくなることによる可能性もある。実際、 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ の底面を感染培養中に倒立顕微鏡で観察すると、細胞はほとんどすきまなく沈んでいた。この事は、 T_P 虫体の HeLa 細胞への感染率は、単層状態で行なった場合によい結果を得ることができることを示しているとも考えられる。

清水 (1961)¹¹⁾ は、 T_P 虫体の細胞内侵入は、たまたま細胞と接触した虫体が、細胞に吸着し、やがて侵入へと発展するものであると示唆している。また、NGUYEN と STADTBAEDER (1979)⁷⁾ は、 T_P 虫体は屈曲運動によって積極的に HeLa 細胞に向い侵入すると報告している。上述のいずれの行動を虫体がとるとしても、細胞と虫体を小さなプラスチック培養フラスコに入れたことは効果があったと考えられる。

また、DVORAK と CRANE (1981)⁴⁾ は、細胞周期が G_1 期から S 期にかけての HeLa 細胞は、 T_P 虫体に感染しやすいと報告している。この事から、細胞周期を同調化した細胞を感染培養に用いたならば、更に高い虫体の細胞感染率が得られるのではないかと推察される。

BRAVENY ら (1978)³⁾ は、培養液 100 ml の入っている 1,000 ml の glass Roux flask で human larynx carcinoma 細胞を単層培養し、 $2.5 \sim 5.0 \times$

10^6 T_P /Roux flask の T_P 虫体を感染させ、感染 2~3 日後に最高 250 倍 (平均 167 倍) の虫体を採取している。本研究における T_P 虫体増殖培養では、虫体が、 3.6×10^6 T_P /ml になるように調整された培養液 250 ml を 84 時間培養して、17.3~18.6 倍 (平均 17.95 倍) の虫体を採取した。倍数では、明らかに彼らの成績の方が多いが、総採取量で比較すると、彼らの成績では、 1.2×10^5 T_P /ml の虫体を感染させた際、1 個のフラスコあたり平均で 1.03×10^9 個の虫体を採取された。本研究においては、 3.6×10^6 T_P /ml の虫体を感染させた際、1 個の培養ビンあたり平均 1.62×10^9 個の虫体を採取したことになり、ほぼ同程度の収量が得られた。

T_P 虫体を、3 年間、HeLa 細胞の単層培養で継代し続け、浮遊培養中の HeLa 細胞に感染すると、比較的大量の虫体を採取し得るとの報告がある¹²⁾。マウス腹腔内で継代し続けた虫体は、細胞への感染率および増殖率が低いと考えられているので¹¹⁾、VALKOUN と CINÁTL (1979)¹²⁾ の手技による T_P 虫体を用いて感染培養を行なえば、感染率や採取量がより増加する可能性を有するものである。

細胞と虫体の割合が 1:5 よりも 1:10 の場合が、細胞に穿入する虫体数が多い傾向は、清水 (1961)¹¹⁾ や KAUFMAN と MALONEY (1962)⁶⁾ の報告と一致する。また、細胞と虫体の割合が 1:5 の場合は、1:10 の場合よりも虫体の細胞感染率が低いにもかかわらず、虫体採取量は増加した。この事は、 T_P 虫体が増殖培養中に細胞を破壊し、培養液中に遊出し、再び非感染細胞に穿入して増殖を繰り返すことを示唆するものと思われる。更にまた、少数の虫体が細胞に穿入しても、その細胞は重篤な障害を受けずに長期間生存し、その間に穿入虫体が細胞内で増殖して含有虫体数を多くする。その結果、虫体の細胞感染率が低くとも虫体採取量が多くなるという可能性も否定できない。これに反し、多数の虫体が細胞に穿入すると、細胞は障害を受け、短期間のうちに死滅し、その結果、細胞の含有虫体数が少なくなるとも考えられる。

以上の如く、 T_P 虫体増殖に関して諸種の考察が成り立つが、少なくとも本研究の結果は、浮遊培養により大量の HeLa 細胞と T_P 虫体の採取が可能であることを示している。

今後、連続的に T_P 虫体を採取するためには、浮遊培養中の HeLa 細胞に T_P 虫体を感染させ、適宜、増

殖した虫体と細胞残渣を取り除き、新鮮な培養液を補充する等の検討が必要である。

文 献

- 1) 別所元茂 (1981) *Toxoplasma gondii* の可溶性及び粒子画分による免疫マウスの体液性抗体応答. 寄生虫学雑誌, 30: 57-65.
- 2) BETZ, A. (1968): Diagnostic sérologique de la toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires. Bull. Wld Hlth Org., 39: 367-374.
- 3) BRAVENY, I., W. WINTER and R. DISCO (1978): A method of mass cultivation of *Toxoplasma gondii* in cell culture. Tropenmed. Parasit., 29: 432-434.
- 4) DVORAK, J. A. and M. ST. J. CRANE (1981): Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. Science, 214: 1034-1036.
- 5) 梶原和人 (1976): 浮遊培養法, 組織培養 (中井準之助 他編), 68-79頁, 朝倉書店, 東京.
- 6) KAUFMAN, H. E. and E. D. MALONEY (1962): Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. J. Parasitol., 48: 358-361.
- 7) NGUYEN, B. T. and S. STADTSBEADER (1979): Modes d'entrée des trophozoites de *Toxoplasma gondii* dans les macrophages péritonéaux de souris normales et dans les cellules HeLa en culture. Une étude microcinématographique en contraste de phase. Z. Parasitenkd., 60: 135-146.
- 8) OMATA, Y., T. NAKABAYASHI and N. SUZUKI (1979): Different appearance parasitized erythrocytes in blood between normal and *Toxoplasma*-infected rats after infection of *Plasmodium berghei*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., A 244: 362-373.
- 9) OMATA, Y., K. YAGAMI, Y. TAKEI, N. SUZUKI and T. NAKABAYASHI (1981): Protective reaction against malaria infection in mice sensitized with frozen-thawed *Toxoplasma* tachyzoites. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., A 250: 223-235.
- 10) 鳥袋 哲 (1980): *Toxoplasma gondii* の可溶性及び粒子画分免疫マウスマクロファージによる in vitro 抗トキソプラズマ作用. 日本熱帯医学会雑誌, 8: 173-185.
- 11) 清水亀平次 (1961): Toxoplasmosis に関する研究 III. *Toxoplasma gondii* の組織培養について. 日本獣医学雑誌, 23: 33-44.
- 12) VALKOUN, A. and J. CINATL (1979): Propagation of *Toxoplasma gondii* in suspension cultures of HeLa cells. Folia Parasitol. (Praha), 26: 165-167.

Summary

In order to clarify the defence mechanism of *Toxoplasma* antigen against various infections and its effect on the infection, mass cultivation of *Toxoplasma* is necessary. At present, *Toxoplasma* is generally propagated by passages in mice or in embryonated hen's eggs. This makes the collection of *Toxoplasma* organisms free of contamination with heterogenous antigens impossible. It has been reported that non-contaminated *Toxoplasma* can be collected from *Toxoplasma* grown in tissue culture (2, 11).

1×10^7 HeLa cells which had grown in monolayer and 0.5×10^8 *Toxoplasmas* which were obtained from peritoneal exudate of mice 2 days after infection were cultured together in a small plastic culture flask for 6 hours, before they were transferred to a spinner culture apparatus and incubated in culture medium. After 84 hours, 17.3-18.6 times the number of the inoculated *Toxoplasmas* could be harvested. Non-infected HeLa cells could be incubated for 8 days in the spinner culture apparatus.

The results show the possibility that, in future, a large number of *Toxoplasmas* could be harvested when HeLa cells are cultivated in spinner culture prior to collection and infection with *Toxoplasma*, and incubated again in the

spinner culture apparatus.